

RK1

PO 99 / 0 4 3 8 5



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

REC'D 18 AUG 1999

WIPO

PCT

09/720 54

Bescheinigung

Certificate

Attestation

5

Die angehefteten Unterla-  
gen stimmen mit der  
ursprünglich eingereichten  
Fassung der auf dem näch-  
sten Blatt bezeichneten  
europäischen Patentanmel-  
dung überein.

The attached documents  
are exact copies of the  
European patent application  
described on the following  
page, as originally filed.

Les documents fixés à  
cette attestation sont  
conformes à la version  
initialement déposée de  
la demande de brevet  
européen spécifiée à la  
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

98830381.4


## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts:  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

  
A. POTT

DEN HAAG, DEN  
THE HAGUE,  
LA HAYE, LE

12/08/95

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

CT/EP 99 / 0 4 3 8 5

**Blatt 2 der Bescheinigung**  
**Sheet 2 of the certificate**  
**Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.:  
Application no.:  
Demande n°: 98830381.4

Anmeldetag:  
Date of filing:  
Date de dépôt: 24/06/98

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):  
Tofani, Santi  
10010 Burolo (To)  
ITALY

Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:  
Apparatus and method for interfering with pathological cells survival

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:  
State:  
Pays:

Tag:  
Date:  
Date:

Aktenzeichen:  
File no.  
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:  
International Patent classification:  
Classification internationale des brevets:

A61N2/02

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:  
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE  
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:

The title of the application in Italian reads as follows :  
Apparecchiatura e metodo per interferire con il meccanismo di sopravvivenza di cellule malate

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- 1 -

TITOLO

APPARECCHIATURA E METODO PER INTERFERIRE CON IL  
MECCANISMO DI SOPRAVVIVENZA DI CELLULE MALATE

DESCRIZIONE

5 La presente invenzione riguarda una apparecchiatura per interferire con i meccanismi di sopravvivenza di cellule malate.

Inoltre, l'invenzione riguarda un metodo microbiologico attuato da detta apparecchiatura per  
10 interferire con i meccanismi di sopravvivenza di cellule malate, in specie cellule affette da tumore o altre malattie causate da alterazioni nel meccanismo di sopravvivenza cellulare.

In particolare, l'interferenza è indotta da campi  
15 statici (S) ed elettromagnetici a frequenza estremamente bassa (ELF) prodotti dalla apparecchiatura.

Campi magnetici statici e campi elettromagnetici a frequenza estremamente bassa sono rispettivamente di seguito indicati anche con S e ELF. Inoltre, qui di  
20 seguito, qualsiasi possibile combinazione di sequenze diverse di campi S seguita da campi ELF; campi ELF seguiti da campi S; campi S sovrapposti a campi ELF nonché la sola presenza di campi S o campi ELF, verrà indicata come campi SELF.

25 Descrizione della tecnica nota

È noto che campi e correnti pericellulari indotti da campi elettromagnetici con frequenza estremamente bassa (ELF), compresa nell'intervallo tra 1 Hz e 300 Hz e forse  
30 fino a 1000 Hz, inducono all'interno delle cellule alcuni fenomeni elettrochimici a livello di membrana che sono importanti per la trasduzione biologica primaria del segnale e per i processi di amplificazione.

Questi fenomeni di origine biochimica producono quindi messaggeri citoplasmatici secondari e stimolatori

- 2 -

interni quali il  $\text{Ca}^{++}$  libero e la proteina fosforilasi (chinasi) che a loro volta catalizzano certi cambiamenti nella sintesi biologica delle macro molecole, oltre a produrre modifiche nelle proprietà funzionali e di differenziazione della crescita cellulare [<sup>1</sup>M. Blank, 1993].

È stata anche documentata la possibilità che campi S e ELF modifichino la sintesi del DNA, l'integrità del DNA, la trascrizione e la traslazione. [<sup>2</sup>Liboff 1984, <sup>3</sup>Tofani 1995, <sup>4</sup>Goodman 1991, <sup>5</sup>Phillips 1992].

Un possibile meccanismo fisico per giustificare alcuni dei risultati sperimentali è l'effetto diretto sugli ioni (quali il  $\text{Ca}^{++}$ ) o sui legami che avvengono nella membrana cellulare [<sup>6</sup>Liboff 1985, <sup>7</sup>Chiabrera 1985, <sup>8</sup>Lednev 1991, <sup>9</sup>Blanchard 1994].

La possibilità di influenzare le variazioni del metabolismo del  $\text{Ca}^{++}$  può portare ad influenzare l'apoptosi della cellula (morte cellulare programmata). [<sup>10</sup>Preston, <sup>11</sup>Trump 1997].

Un altro meccanismo di interazione fisica è correlato alla possibilità di influenzare la cinetica di determinati percorsi di segnalazione cellulare (incluso il metabolismo del calcio) attraverso un effetto diretto del campo sul movimento dello spin elettronico degli atomi e delle molecole con elettroni disaccoppiati. Questa influenza può portare ad un effetto sul rapporto di combinazione di coppie di radicali liberi con spin correlato e di conseguenza sulla segnaletica Redox. [<sup>12</sup>Grundler 1992; <sup>13</sup>Polk 1992; <sup>14</sup>Walleczek e Budingher 1992; <sup>15</sup>Adey 1993].

La possibilità che campi magnetici S e ELF a basso livello, non termici (con intensità fino a 30 mT) influenzino in vitro la cinetica e l'efficacia delle reazioni di coppie di radicali è nota dalla magneto-

- 3 -

chimica [<sup>16</sup>Steiner 1989].

Radicali liberi esistenti in natura hanno un elettrone spaiato originato da ossigeno o azoto come ad esempio un anione superossido, un radicale idrossilico e un ossido nitrico. Queste specie reattive di ossigeno (ROS) e specie reattive di azoto (RNS) possono mirare alle proteine, fornendo una spiegazione meccanicistica immediata dei fenomeni di segnalazione mediati da radicali liberi. Questi fenomeni possono influenzare i fattori di crescita, il trasporto ionico (quale i canali Ca<sup>++</sup>), la trascrizione, l'apoptosi [<sup>17</sup>Lander 1997].

L'apoptosi è una forma morfologicamente distinta di morte cellulare programmata che svolge un compito principale durante lo sviluppo, l'omeostasi, ed in molte patologie tra le quali il cancro, la sindrome da immunodeficienza acquisita, i disturbi neurodegenerativi. L'apoptosi ha luogo attraverso l'attuazione di un programma suicida intrinseco alla cellula. Il meccanismo genetico di base per avviare l'apoptosi sembra essere presente essenzialmente in tutte le cellule di mammiferi e per tutta la loro vita, ma l'attivazione di questo programma suicida è regolato da molti segnali diversi, che hanno origine sia dall'ambiente intracellulare che da quello extracellulare.

Tra tutti i geni coinvolti nella regolazione apoptotica, il gene p53 è quello attualmente più studiato. Questo gene, che codifica un fattore di trascrizione ed è comune in molti tumori dell'essere umano, funge da mediatore delle risposte cellulari in occasione di alcuni danneggiamenti all'ambiente cellulare. La proteina p53 può sia impedire temporaneamente la divisione cellulare, in modo che le cellule possono riparare il DNA danneggiato, sia può pilotare la cellula ad una morte apoptotica.

Dati pubblicati sostengono la tesi che l'apoptosi

- 4 -

abbia luogo attraverso un processo a tre fasi: 1) induzione trascrizionale di tipo redox di geni; 2) formazione di specie reattive di ossigeno; e 3) la degradazione ossidativa dei componenti mitocondriali, culminante nella morte cellulare [<sup>18</sup>Polyak 1997].

Inoltre, dati pubblicati sostengono l'ipotesi che le cellule malate rispondono diversamente rispetto alle cellule sane se stimolate da campi ELF. Secondo <sup>19</sup>Cadossi [1992] i linfociti di pazienti normali rispondono diversamente rispetto ai linfociti prelevati da pazienti con sindrome di down, AIDS e leucemia linfocitica cronica quando esposti a campi ELF (preventivamente trattati con mitogeni).

È anche stato riconosciuto che campi ELF influenzano la variazione di flusso di  $Ca^{++}$  calcio attraverso la membrana di linfociti leucemici e non attraverso quella di linfociti normali [<sup>20</sup>Walleczek, 1996].

Con riferimento alla chemioterapia sono stati fatti molti sforzi con l'obiettivo di indurre in vivo le cellule in apoptosi invece di distruggerle, attraverso la "Signal Transduction Directed Therapy" (STDT) del cancro [<sup>21</sup>Levin, 1998].

"Signal Transduction" è un termine operativo che connota la traslazione di informazioni genetiche in cascate di segnali che permettono alla cellula di, per esempio, interpretare e rispondere agli stimoli esterni e/o duplicare sé stessa. Esperimenti recenti suggeriscono che l'alterazione nel sistema di sopravvivenza della cellula contribuisce alla patogenesi di alcune malattie umane, tra le quali il cancro, infezioni virali, malattie del sistema immunitario, disturbi neurodegenerativi, e AIDS. Trattamenti atti ad alterare specificamente la soglia apoptotica possono avere l'effetto di modificare il progredire naturale di alcune di dette malattie



- 5 -

[<sup>22</sup>Thompson, 1995].

Sono stati anche usati campi elettrici, elettromagnetici e magnetici di elevata intensità per distruggere cellule malate.

5 In <sup>23</sup>US4665898 è descritta una apparecchiatura nella quale animali con cellule cancerose sono stati sottoposti a trattamento utilizzando un campo magnetico pulsato ad alta intensità, in modo da neutralizzare/distruggere le cellule malate in modo selettivo. Questa apparecchiatura  
10 produce campi magnetici termici aventi intensità compresa tra 1 Tesla fino a 10 Tesla e con inversione di polarità in un intervallo compreso tra 5 e 1000 kHz. Nella forma realizzativa preferita l'intensità del campo magnetico è fissata tra 1 e 50 T ed in particolare, negli esempi, essa  
15 è fissata a 5 T ed 8 kHz fino a 18 T e 250 kHz.

Sono stati utilizzati in vitro su cellule cancerose anche altri campi ELF, termici, continui o pulsati. [<sup>24</sup>Narita, 1997; <sup>25</sup>Raylman, 1996].

In tutti questi casi, i campi sono di intensità  
20 molto elevata, molto più alta rispetto a quella permessa dalle normative di sicurezza per la salute delle persone, e può produrre riscaldamento nonché danneggiamento per i tessuti e le cellule sane.

#### Sintesi dell'invenzione

25 È uno scopo della presente invenzione fornire un metodo per interferire con il meccanismo di sopravvivenza cellulare di cellule malate viventi, ad esempio cellule cancerose, in particolare inducendo l'apoptosi, utilizzando campi magnetici senza avere effetti negativi  
30 sulle cellule normali.

È un altro scopo dell'invenzione fornire una apparecchiatura per interferire con il meccanismo di sopravvivenza di cellule malate.

Il primo ed altri scopi sono raggiunti dal metodo

- 6 -

per interferire con il meccanismo di sopravvivenza di cellule malate la cui caratteristica è di applicare a cellule malate viventi, ad esempio cellule cancerose ed altre cellule malate per effetto di alterazione nel  
5 meccanismo di sopravvivenza cellulare, campi magnetici SELF non termici, per indurre l'apoptosi in modo selettivo.

Per gli scopi della presente invenzione, per campi SELF si intendono le diverse possibili sequenze di campi S  
10 seguiti da campi ELF; campi ELF seguiti da campi S; campi S sovrapposti a campi ELF nonché la sola presenza di campi S o campi ELF.

Il concetto che sta alla base del metodo secondo l'invenzione è che i campi SELF interferiscono sulla  
15 segnalazione cellulare che sta sostenendo il comportamento patologico all'interno delle cellule malate, ad esempio sulla segnalazione redox attraverso radicali liberi, inducendo così l'apoptosi attraverso una modificazione dell'espressione genica p53.

La ragione per cui i campi SELF inducono  
20 selettivamente l'apoptosi in cellule malate, ad esempio in cellule cancerose, può essere correlata alla alterazione in concentrazioni ioniche nei siti di legame, nonché nella corrispondente attività enzimatica della cellula malata  
25 confrontata con quella di una cellula normale.

Per questi motivi i campi SELF possono indurre mediante segnali una morte cellulare programmata (apoptosi) senza comportare effetti collaterali.

Per gli stessi motivi i campi SELF non termici  
30 possono essere potenzialmente utilizzati per il trattamento di cellule affette da molte malattie oltre ai tumori, tra cui infezioni virali, AIDS, disturbi del sistema autoimmunitario, ecc., dove la alterazione della sopravvivenza cellulare contribuisce alla loro patogenesi.

- 7 -

Secondo l'invenzione, un'apparecchiatura per interferire selettivamente (apoptosi) sul meccanismo di sopravvivenza di cellule malate in vitro ed in vivo ha la caratteristica di comprendere mezzi per generare campi magnetici statici (S) che attraversano un ambiente di lavoro e mezzi per generare nell'ambiente di lavoro campi elettromagnetici a frequenza estremamente bassa (ELF) singolarmente od in aggiunta ai campi S.

Sono previsti mezzi per modulare i campi S associati ai mezzi per generare i campi S ed atti a variare l'intensità dei campi S da 1 a 30 mT.

Sono anche previsti mezzi per modulare i campi ELF singolarmente o associati ai mezzi per modulare i campi S ed atti ad imporre ai campi ELF una frequenza compresa tra 1 e 1000 Hz con intensità compresa tra 1 e 30 mT.

Preferibilmente i campi ELF hanno una frequenza compresa tra 10 e 100 Hz. Inoltre, i campi S ed ELF possono essere sottoposti a variazione della loro intensità dopo periodi di lunghezza prefissata, quali in particolare periodi compresi tra 1 e 40 minuti.

Secondo un particolare aspetto dell'invenzione quando nell'apparecchiatura ai campi S sono aggiunti i campi ELF vengono ottenuti campi SELF con un rapporto S/ELF compreso tra 0,5 e 5.

In una particolare forma realizzativa dell'invenzione l'intensità dei campi S ed ELF è fissata da relativi mezzi di modulatori dell'apparecchiatura tra 1 e 10 mT e rapporto in intensità tra i campi S e i campi ELF è compreso tra 0,5 e 2,5.

Almeno una porzione dell'ambiente di lavoro è definito da pareti permeabili ai campi S ed ELF. Almeno una porzione dell'ambiente di lavoro è anche vantaggiosamente adiacente ad una prima ed una seconda bobina, e i mezzi per modulare forniscono alle bobine

- 8 -

rispettivamente corrente continua ed alternata.

Alcuni esempi dell'apparecchiatura sono illustrati nei disegni annessi, aventi scopo esemplificativo e non limitativo.

5 In figura 1, l'ambiente di lavoro è indicato con 1 e la parete con 2. La prima e la seconda bobina sono indicate con 3 e 4. I mezzi per modulare sono indicati schematicamente da rettangoli 5 e 6 rispettivamente, e sono connessi ad alimentazione di corrente continua ed  
10 alternata.

Nella figura 2, una forma realizzativa differente dall'apparecchiatura, usata per interferire con la sopravvivenza di cellule malate sia in vitro che in vivo, ha due bobine 23 e 24 disposte coassialmente l'una  
15 rispetto all'altra ai lati opposti dell'ambiente di lavoro 21. Sono previsti trasformatori variabili 25 e 26 connessi ad una rete elettrica 27 a 50 hertz. Sono presenti ponti diodi 28 che sono inseribili nel circuito per modificare l'alimentazione a corrente alternata delle bobine.  
20 Possono essere anche previsti un trasformatore in corrente continua 29a, un raddrizzatore 29b ed un temporizzatore 29c per mettere in tensione due piastre 29 in modo che possa essere creato nell'ambiente di lavoro 21 un campo elettrico statico (o variabile a bassa frequenza fino a  
25 1000 Hz) ad intervalli desiderati fino a 20kV/m, e preferibilmente intorno a 6kV/m, in funzione delle condizioni sperimentali.

In figura 3 è illustrata una ulteriore forma realizzativa dell'apparecchiatura utilizzata per  
30 interferire con la sopravvivenza in vitro di cellule malate. Essa ha un modulatore SELF 35 (1-100 Hz) e due bobine 33 e 34 disposte coassialmente una rispetto all'altra dai lati opposti di un ambiente di lavoro 31. Un amplificatore 36 è utilizzato tra il modulatore 35 e le

- 9 -

bobine 33 e 34, che sono alimentate con la medesima corrente creando nell'ambiente 31 o un campo S o un campo ELF.

Una ulteriore forma realizzativa della  
5 apparecchiatura secondo l'invenzione, illustrata in figura 4, è utilizzata per interferire con la sopravvivenza di cellule malate sia in vitro che in vivo. Essa ha due bobine di Helmholtz 43 e 44 disposte coassialmente una rispetto all'altra ai lati opposti dell'ambiente di lavoro  
10 41. Tra il modulatore 45 e le bobine 43 e 44 è inserito un amplificatore 46 attraverso uno shunt 47, anch'esso collegato a un computer 49.

Secondo il metodo microbiologico dell'invenzione, possono essere utilizzati campi SELF non termici per  
15 interferire con la sopravvivenza di cellule malate, come ad esempio cellule affette da cancro, infezioni virali, malattie del sistema autoimmunitario, disturbi neurodegenerativi, AIDS, ecc., e sono caratterizzate da avere intensità compresa tra 1 e 30 mT. I campi SELF vanno  
20 intesi come diverse sequenze di campi S/ELF, quali campi S seguiti da campi ELF, campi ELF seguiti da campi S, campi S ed ELF insieme, nonché la presenza di campi S o ELF singolarmente, detti campi ELF avendo una frequenza compresa tra 1 e 1000 Hz.

25 Secondo un ulteriore aspetto del metodo, possono essere utilizzati campi SELF non termici per la alterazione biotecnologica di geni, come ad esempio per modificare i geni p53 mutanti, e la loro caratteristica è che vengono utilizzati campi SELF non termici aventi  
30 un'intensità compresa tra 1 e 30 mT.

Il metodo può essere effettuato da solo o in combinazione con prodotti chimici.

Il metodo secondo l'invenzione verrà ora illustrato in maggior dettaglio mediante esempi specifici.

- 10 -

ESEMPIO 1

In questo esperimento è stata studiata in vitro la capacità di indurre l'apoptosi mediante campi magnetici SELF come una funzione di intensità dei campi e della  
5 frequenza.

Per l'esperimento è stata utilizzata una tipologia di cellule umane del colon affette da adenocarcinoma (WiDr) cresciute in monostrati confluenti in fiaschette T25. Per ciascuna prova sono state utilizzate 6  
10 fiaschette, ciascuna contenente circa 10 milioni di cellule, tre esposte e tre non esposte.

Durante l'esposizione le fiaschette sono state mantenute tra due bobine collegate con circuiti che hanno fornito corrente continua ed alternata fino a 100 hertz.  
15 La temperatura è stata continuamente controllata e mantenuta a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,2$ .

La durata dell'esposizione è stata di 20 minuti per ciascun esperimento e i campi SELF sono stati mantenuti costanti. Dopo 3 ore le cellule sono state trattate con  
20 May-Grunwald-Giemsa. È stata rilevata la presenza di apoptosi contando il numero di nuclei apoptotici per 10 campi di alta potenza (HPS) utilizzando un microscopio ottico.

L'entità dell'apoptosi indotta è stata stimata dal  
25 rapporto tra il numero di cellule apoptotiche rilevate nel gruppo esposto ed il numero di cellule apoptotiche rilevate nel gruppo non esposto ai campi magnetici secondo l'invenzione.

La tabella 1 riporta i risultati ottenuti in diverse  
30 condizioni di esposizione.

- 11 -

TABELLA 1

condizioni di esposizione	composizione campi SELF	frequenza (Hz)	intensità campi (Statici + ELF rms) mT	rapporto di apoptosi
A	S (static)	-	(0.5 + 0)	1
B	S	-	(1 + 0)	1
C	S	-	(2 + 0)	1.2
D	S	-	(3 + 0)	2
E	S	-	(4 + 0)	2,3
F	S	-	(10 + 0)	2.2
G	S	-	(20 + 0)	2.2
H	S	-	(30 + 0)	2.3
I	ELF	16	(0 + 3)	2.2
L	ELF	33	(0 + 3)	2.2
M	ELF	50	(0 + 3)	2.1
N	ELF	50	(0 + 7)	2,1
O	ELF	66	(0 + 3)	2.2
P	ELF	83	(0 + 3)	2.3
Q	ELF	100	(0 + 3)	2.1
R	S + ELF	50	(4 + 3)	2.1
S	S + ELF	50	50% del tempo (3 + 1) 50% del tempo (4,5+1,5)	2.2

Tutti i risultati sono stati molto significativi dal punto di vista statistico (al t di Student). Dalla tabella 1 è possibile vedere che l'effetto dell'apoptosi compare a 2 mT e raddoppia a partire da 3 mT.

Un altro importante risultato è che l'apoptosi non dipende dalla frequenza dei campi SELF. In altre parole, durante il ciclo vitale del meccanismo che fa funzionare l'effetto biologico di apoptosi, il campo magnetico ELF viene visto sostanzialmente costante. Questo significa che tra i due meccanismi ipotizzati di radicali liberi, le cui dinamiche temporali sono comprese tra i nano- e i micro-secondi, e il meccanismo di tipo a risonanza ionica, quello che effettivamente si verifica è il primo, cioè

- 12 -

attraverso i radicali liberi [<sup>26</sup>Scaiano, 1994, <sup>27</sup>Engstrom, 1997].

### ESEMPIO 2

In questo esperimento è stato verificato l'effetto  
5 selettivo dei campi magnetici SELF esponendo tre tipologie di cellule. Due tipologie erano cancerose, quale cellule umane di adenocarcinoma del colon (WiDr) e cellule umane di cancro della mammella (MCF-7). Le cellule normali usate erano fibroblasti umani del polmone (MRC-5).

10 Come nel caso dell'esempio 1, ciascuna tipologia di cellule è stata cresciuta in monostrati confluenti all'interno di fiaschette T25. Il protocollo sperimentale era il medesimo che nell'esempio 1. Sei fiaschette (tre esposte e tre non esposte) per ciascuna tipologia di  
15 cellule sono state trattate per 20 minuti. L'apoptosi è stata valutata dopo 3 ore. Le condizioni di esposizione erano del tipo R della tabella 1.

I risultati sono riportati in tabella 2.

TABLE 2

tipologia di cellule	rapporto di apoptosi
WiDr	2.1
MCF-7	1.4
MRC-5	1

20 Come illustrato in tabella 2 soltanto le cellule cancerose hanno riportato un incremento di apoptosi altamente significativo dal punto di vista statistico mentre le cellule normali no. La differenza in percentuale di apoptosi tra le due tipologie di cellule cancerose si  
25 ritiene sia dovuta alla diversità tra i tempi di duplicazione delle stesse. Infatti, le WiDr si duplicano più rapidamente delle MCF-7. I risultati sono stati valutati con il test statistico t di Student.

### Esempio 3





- 14 -

dalla N.I.H. (Istituto di Sanità Statunitense) e N.C.I. (Istituto Nazionale Statunitense per il cancro).

Le masse tumorali sono state misurate due volte la settimana e il loro volume calcolato in mm<sup>3</sup> secondo la  
5 formula:

*(Diametro Maggiore) x (Diametro minore al quadrato)/2*

Dopo 4 settimane gli animali sono stati sacrificati ed è stata praticata autopsia. Le masse tumorali sono state estratte, pesate e misurate. Le porzioni di tumore  
10 sono state utilizzate per differenti analisi, quali:

- immunoistochimiche: antigene KI-67 per l'indice di proliferazione, antigene P-53 per l'espressione genica p53;
- istopatologiche: colorazione mediante ematossilina-eosina per la verifica del numero di mitosi;  
15
- ultrastrutturali: microscopio elettronico;
- ibridizzazione dell'acido nucleico: metodo Tunel per la valutazione dell'apoptosi.

In aggiunta, sono stati estratti i seguenti organi da ciascun animale al fine della effettuazione di esami  
20 istologici in modo da determinare la tossicità del trattamento: cervello, cuore, reni, fegato, polmoni, linfonodi ascellari ed inguinali, linfonodi mediastinali, ovaie, cute, milza, midollo osseo, tessuto sottocutaneo  
25 (sede della inoculazione delle cellule tumorali) nonché esame del sangue.

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 3 per il primo esperimento ed in tabella 4 per il secondo.

- 15 -

TABELLA 3

condizioni di esposizione	1	2	3	4	esposti per finta
durata di esposizione (minuti)	70	70	70	70	-
media temporale intensità di campo (S + ELF rms) in mT	3	3	4	6	-
variazione di campo statico in mT (min-max); [min-max] ELF	(4-6) [2-2]	(1.5-4) [1-1]	(2-5) [1.5-3.5]	(2-5) [1.5-3.5]	-
periodi di campo costante (min-max) in minuti	(5-15)	(5-20)	(5-15)	(5-20)	-
tempo % con co-presenza di campi S ed ELF	0%	50%	50%	100%	-
rapporto S/ELF (min-max)	-	(0,5-5)	(0,5-5)	(0,5-5)	-
tempo % con solo campo S	50%	50%	50%	0%	-
numero di topi	6	6	6	6	12
volume massa tumorale estratta (mm <sup>3</sup> )	1323 ± 304	1450 ± 288	920 ± 540	650 ± 205	1492 ± 559
peso massa tumorale estratta(g)	1.54 ± 0.22	1.6 ± 0.39	0.98 ± 0.56	0.96 ± 0.25	1.6 ± 0.5
numero di cellule apoptotiche per 10 HPF	98 ± 23	115 ± 20	129 ± 25	129 ± 26	40 ± 17
espressione p53 per 10 HPF	35.1 ± 0.11	43.8 ± 0.16	38.2 ± 0.06	28.7 ± 0.14	73.2 ± 0.14

TABLE 4

condizioni di esposizione	4 (vedi tab. 3)	esposti per finta
numero di topi	12	12
volume massa tumorale estratta	1139 ± 509 cm <sup>3</sup>	1914 ± 793 cm <sup>3</sup>
peso massa tumorale estratta	1.4 ± 0.7 g	2.1 ± 0.6 g
apoptosi (controllo effettuato solo in 50% dei topi)	72.5 ± 9.3	37.0 ± 7.4
p53	35.6 ± 6.7	78.1 ± 16.7
indice di proliferazione	0.34 ± 0.08	0.45 ± 0.07
mitosi	24.1 ± 10.9	47.7 ± 10.1

I dati riportati nella tabella 3 e 4 mostrano che i campi SELF hanno un effetto inibitorio in vivo sulla

- 16 -

crescita tumorale. Questo effetto, rilevato in entrambi gli esperimenti, è stato molto significativo dal punto di vista statistico (nel primo esperimento, principalmente per la condizione di esposizione 4) utilizzando i test di Dunnet e t di Student rispettivamente.

All'esame istologico dei 12 organi di ciascun animale per tutti i gruppi non sono state rilevate differenze tra i topi esposti e quelli esposti per finta. Non sono altresì emerse differenze all'esame del sangue. Questi risultati provano l'assenza di tossicità a seguito di un trattamento antitumorale mediante campi SELF.

L'analisi ultrastrutturale al microscopio elettronico ha mostrato numerose alterazioni cellulari nelle cellule tumorali degli animali esposti: presenza di corpi apoptotici e cromatina condensata nelle vicinanze della membrana nucleare caratteristica di fenomeni apoptotici.

Inoltre, un risultato importante è dato dalle modificazioni morfologiche, dalla crescita del numero e dalle dimensioni dei mitocondri nonché dal numero di nucleoli, e dalla presenza di molti vacuoli all'interno del citoplasma. Le cellule non neoplastiche (quali le cellule epiteliali e stromali) non hanno mostrato alcuna differenza tra gli animali esposti e quelli esposti per finta concordemente con l'assenza di tossicità rilevata nei 12 organi normali esaminati in ciascun animale.

L'incremento di apoptosi e il decremento della espressione genica p53 rilevata nei tumori dei topi esposti (vedere tavole 3 e 4) sono molto significative dal punto di vista statistico (test t Student).

I risultati riportati in tabella 3 e 4 sono in accordo con quelli ottenuti in vitro illustrati nelle tabelle 1 e 2.

Gli effetti indotti dai campi magnetici SELF sull'espressione genica p53 rafforzano i risultati

- 17 -

sull'apoptosi e sono in accordo con il meccanismo biofisico ipotizzato (legato alla ricombinazione di radicali liberi) in base al quale i campi SELF hanno un effetto antitumorale a seguito della formazione di specie reattive di ossigeno e la degradazione dei componenti mitocondriali.

#### ESEMPIO 4

In questo esperimento topi nudi (nu/nu) precedentemente trattati con inoculazione sottocutanea di 10 milioni di cellule di adenocarcinoma del colon umano (WiDr) sono stati esposti per studiare l'influenza del trattamento sulla loro sopravvivenza.

Dopo l'inoculazione delle cellule sono stati formati due gruppi di topi in modo casuale rispettivamente di 16 animali esposti e 17 animali esposti per finta. I topi del primo gruppo sono stati esposti 70 minuti una volta al giorno per 5 giorni la settimana, per tutta la loro vita a partire da 24 ore dopo l'inoculazione tumorale.

Le condizioni di esposizione sono state le stesse dell'esperimento i cui risultati sono stati riportati in tabella 4.

Come nel precedente esempio, i topi sono stati mantenuti in ambiente libero da patogeni e riforniti con una dieta a volontà. Tutti i test sono stati condotti secondo il protocollo emesso dalla N.I.H. e dalla N.C.I..

L'efficacia antitumorale del trattamento è stata valutata utilizzando la formula N.C.I.: rapporto tra la vita media degli animali esposti e quella degli animali esposti per finta. Questa vita media è stata valutata sommando per ciascun gruppo sperimentale il tempo di sopravvivenza di ogni animale diviso per il numero di animali. L'efficacia sull'aumento della sopravvivenza viene raggiunto quando la formula N.C.I. dà come risultato un indice uguale o maggiore a 1.25.

- 18 -

La tabella 5 riporta per ciascun gruppo sperimentale il numero di animali viventi in diversi momenti (giorni) calcolati dall'inizio dell'esperimento.

TABELLA 5

topi viventi esposti/ esposti per finta (giorni)	16/16 (48)	16/15 (73)	15/14 (76)	14/14 (84)	13/14 (87)	12/14 (88)
topi viventi esposti/ esposti per finta (giorni)	12/13 (97)	12/12 (107)	10/12 (109)	10/10 (114)	10/9 (115)	9/8 (125)
topi viventi esposti/ esposti per finta (giorni)	9/7 (149)	8/6 (153)	8/5 (155)	8/4 (157)	7/4 (163)	7/3 (173)
topi viventi esposti/ esposti per finta (giorni)	6/3 (183)	6/2 (192)	6/0 (194)	5/0 (195)	4/0 (203)	3/0 (257)
topi viventi esposti/ esposti per finta (giorni)	2/0 (276)	1/0 (323)	0*/0 *sacrificato (326)			

5 La formula N.C.I. applicata ai risultati riportati in tabella 5 dà un indice uguale a 1.31 che è maggiore di 1.25. Dopo 194 giorni 6 dei topi esposti erano ancora in vita mentre tutti i topi esposti per finta erano deceduti

La descrizione di cui sopra di una forma  
 10 realizzativa specifica è in grado di mostrare l'invenzione dal punto di vista concettuale in modo che altri, utilizzando la tecnica nota, potranno modificare e/o adattare in varie applicazioni tale forma realizzativa specifica senza ulteriori ricerche e senza allontanarsi  
 15 dal concetto inventivo, e , quindi, si intende che tali adattamenti e modifiche saranno considerabili come equivalenti della forma realizzativa specifica. I mezzi e i materiali per realizzare le varie funzioni descritte potranno essere di varia natura senza per questo uscire  
 20 dall'ambito dell'invenzione. Si intende che le espressioni o la terminologia utilizzate hanno scopo puramente descrittivo e per questo non limitativo.

- 19 -

---

REFERENCES

<sup>1</sup> Blank M (1993): "Electricity and Magnetism in Biology and Medicine". The First World Congress for Electricity and Magnetism in Biology and Medicine, Orlando, Florida.

<sup>2</sup> Liboff AR, Williams T Jr, Strong DM and Wistar R. Jr. (1984): "Time-Varying Magnetic Fields: Effect on DNA Synthesis". Science, Vol. 223, pp 818-820.

<sup>3</sup> Tofani S, Ferrara A, Anglesio L, Gilli G (1995): "Evidence for genotoxic effects of resonant ELF magnetic fields". Bioelectrochemistry and Bioenergetics 36, pp 9-13.

<sup>4</sup> Goodman R, Shirley-Henderson A (1991): "Transcription and Translation in Cells exposed to Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields" Bioelectrochem. Bioenerg. 25, pp. 335-355.

<sup>5</sup> Phillips jl, Haggren w, Thomas WJ, Ishida-Jones T and Adey WR (1992): "Magnetic field-induced changes in specific gene transcription". Biochimica et Biophysica Acta 1132, pp 140-144.

<sup>6</sup> Liboff AR (1985): Cyclotron resonance in membrane transport. In Chiabrera A, Nicolini C., Schwan HP (eds): "Interactions Between Electromagnetic Fields and Cells". New York: Plenum Press, pp 281-296.

<sup>7</sup> Chiabrera A., Grattarola M., Viviani R. (1984): "Interaction between electromagnetic fields and cells: Microelectrophoretic effect on ligands and surface receptors". Bioelectromagnetics 5, pp173-191.

<sup>8</sup> Lednev VV (1991): "Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems". Bioelectromagnetics 12, pp 71-75.

- 20 -

<sup>9</sup> Blanchard JP, Blackman CF (1994): "Clarification and application of an ion parametric resonance model for magnetic field interactions with biological systems. Bioelectromagnetics 15, pp217-238.

<sup>10</sup> Preston GA, Barrett JC, Biermann JA and Murphy Elizabeth (1997): "Effects of Alterations in Calcium Homeostasis on Apoptosis during Neoplastic Progression", Cancer Research 57, pp. 537-542.

<sup>11</sup> Trump BF, Berezsky IK, Chang SH and Phelps PC (1997): "The Pathways of Cell Death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis". Toxicologic Pathology Vol. 25, n. 1, pp.82-87.

<sup>12</sup> Grundler W, Kaiser F, Keilmann F, Walleczek J (1992): "Mechanisms of electromagnetic interaction with cellular systems". Naturwissenschaften 79, pp. 551-559.

<sup>13</sup> Polk C (1992): "Dosimetry of extremely-low-frequency magnetic fields". Bioelectromagnetics Suppl 1, pp. 209-235

<sup>14</sup> Walleczek J, Budinger TF (1992): "Pulsed magnetic field effects on calcium signalling in lymphocytes: Dependence on cell status and field intensity". FEBS Lett 314, pp 351-355.

<sup>15</sup> Adey WR (1993): Electromagnetics in biology and medicine. In Matsumoto H (ed): "Modern Radio Science", New York: Oxford University Press, pp 227-245.

<sup>16</sup> Steiner UE and Ulrich T (1989): "Magnetic Field Effects in Chemical Kinetics and Related Phenomena". Chem. Rev. 89, pp. 51-147.



- 21 -

<sup>17</sup> Lander HM (1997): "An essential role for free radicals and derived species in signal transduction". The FASEB Journal 11, pp118-124.

<sup>18</sup> Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzier KW and Volgestein B (1997): "A model for p53-induced apoptosis". Nature Vol. 389, pp. 300-305.

<sup>19</sup> Cadossi R, Bersani F, Cossarizza A, Zucchini P, Emilia G, Torelli G and Claudio Franceschi (1992): "Lymphocytes and low-frequency electromagnetic fields". The FASEB Journal Vol. 6, pp.2667-2674.

<sup>20</sup> Walleczek J (1996): "Electromagnetic Field Effects on Cellular Signal Transduction and Free Radical Mechanisms". Abstract Book XXVth General Assembly of the International Union of Radio Science-Lille-France, p. 547.

<sup>21</sup> Levin VA (1998): "Signal Transduction Directed Therapy: Fact or Fantasy?" Abstract Book (EL 5) of the Eight International Congress on Anti-Cancer Treatment, February 3<sup>rd</sup>-6<sup>th</sup> 1998, Paris, France.

<sup>22</sup> Thompson C.B. (1995): "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases" Science Vol. 267, p. 1456-1462

<sup>23</sup> Costa JL and Hofmann GA (1987): "Malignancy treatment" U.S. patent 4,665,898.

<sup>24</sup> Narita K, Hanakawa K, Kasahara T, Hisamitsu T, Asano K (1997): "Induction of apoptotic cell death in human leukemic cell line, HL-60, by extremely low frequency electric magnetic fields: analysis of the possible mechanisms in vitro". In vivo 11(4), pp. 329-335.

<sup>25</sup> Raylman RR, Clavo AC, Wahl RL (1996): "Exposure to Strong Static Magnetic Field Slow the Growth of Human

- 22 -

Cancer Cells In Vitro". Bioelectromagnetics 17, pp. 358-363.

<sup>26</sup> Scaiano JC, Mohtat N, Cozens FL, McLean J and Thansandote (1994): "Application of the Radical Pair Mechanism to Free Radicals I Organized Systems: Can the Effects of 60 Hz Be Predicted From Studies Under Static Fields?" Bioelectromagnetics 15, pp.549-554.

<sup>27</sup> Engstrom S (1997): "What is the Time of Magnetic Field Interaction in Biological Systems?". Bioelectromagnetics 18, pp. 244-249.

<sup>28</sup> B.S. Thornton (1984): "Inversion of raman spectra of living cells indicates dielectric structure related to energy control", in Physics Letters, Vol. 106A, pp. 198-202.

<sup>29</sup> S.T. Barsamian (1987): "Dielectric origin of living cells", in Biophysical Aspects of Cancer, Charles University Prague, pp. 152-159

- 23 -

RIVENDICAZIONI

1. Apparecchiatura per interferire selettivamente sulla sopravvivenza di cellule malate, in particolare inducendo apoptosi, in vitro ed in vivo, caratterizzato dal fatto di comprendere:
- mezzi per generare campi magnetici statici S che attraversano un ambiente di lavoro,
  - mezzi per generare campi elettromagnetici a frequenza estremamente bassa (ELF) attraverso detto ambiente di lavoro in aggiunta detti campi statici S;
  - mezzi per modulare detti campi S associati a detti mezzi per generare detti campi S, detti mezzi per modulare detti campi S variando l'intensità di detti campi S tra 1 e 30 mT;
  - mezzi per modulare detti campi ELF associati a detti mezzi per generare campi ELF, detti mezzi per modulare detti campi ELF imponendo a detti campi ELF una frequenza compresa tra 1 e 1000 Hz con intensità compresa tra 1 e 30 mT.
2. Apparecchiatura per interferire selettivamente sulla sopravvivenza di cellule malate, in particolare inducendo apoptosi, in vitro ed in vivo, caratterizzato dal fatto di comprendere:
- mezzi per generare campi magnetici statici S che attraversano un ambiente di lavoro,
  - mezzi per modulare detti campi S associati a detti mezzi per generare detti campi S, detti mezzi per modulare detti campi S variando l'intensità di detti campi S tra 1 e 30 mT;
3. Apparecchiatura per interferire selettivamente sulla sopravvivenza di cellule malate, in particolare inducendo apoptosi, in vitro ed in vivo, caratterizzato dal fatto di comprendere:
- mezzi per generare campi elettromagnetici a frequenza

- 24 -

estremamente bassa (ELF) attraverso detto ambiente di lavoro in aggiunta a detti campi statici S;

- mezzi per modulare detti campi ELF associati a detti mezzi per generare campi ELF, detti mezzi per modulare  
5 detti campi ELF imponendo a detti campi ELF una frequenza compresa tra 1 e 1000 Hz con intensità compresa tra 1 e 30 mT.

4. Apparecchiatura secondo le rivendicazioni 1 e 2, in cui detti mezzi per modulare detti campi S determinano una  
10 variazione a detti campi S che rimane tale per periodi prefissati.

5. Apparecchiatura secondo la rivendicazione 1 e 3, in cui detti mezzi per modulare detti campi ELF impongono a detti campi ELF una frequenza compresa tra 10 e 100 Hz.

15 6. Apparecchiatura secondo le rivendicazioni precedenti, in cui detti campi S sono aggiunti a detti campi ELF ottenendo campi SELE con rapporto S/ELF compreso tra 0,1 e 5.

7. Apparecchiatura secondo le rivendicazioni precedenti,  
20 in cui l'intensità di detti campi S ed ELF è fissata da detti mezzi modulatori tra 1 e 10 mT e il rapporto tra i campi S e i campi ELF è compreso tra 0,5 e 2,5.

8. Apparecchiatura secondo le rivendicazioni precedenti in cui almeno una porzione di detto ambiente di lavoro è  
25 definito da pareti permeabili a detti campi.

9. Apparecchiatura secondo le rivendicazioni precedenti in cui detti mezzi per generare detti campi S e/o ELF comprende almeno una prima ed una seconda bobina rispettivamente circondanti almeno una porzione di detto  
30 ambiente di lavoro, detti mezzi per modulare fornendo a dette bobine rispettivamente corrente continua e/o alternata.

10. Apparecchiatura secondo le rivendicazioni da 1 a 8, in cui detti mezzi per generare detti campi S e/o ELF

- 25 -

comprendono almeno una prima di una seconda bobina coassiale l'una all'altra, detto ambiente di lavoro essendo disposto tra detta prima e detta seconda bobina e detti mezzi per modulare fornendo a dette bobine  
5 rispettivamente corrente continua e/o alternata.

11. Apparecchiatura secondo le rivendicazioni precedenti, in cui sono previsti mezzi per creare attraverso detto ambiente di lavoro un campo elettrico statico, o variabile a bassa frequenza fino a 1000 Hz, di intensità fino a 20  
10 kV/m.

12. L'uso di campi SELF non termici per interferire selettivamente sulla sopravvivenza di cellule patologiche, quali in particolare cellule affette da cancro, infezioni virali, malattie autoimmunitarie, disturbi neurode-  
15 generativi, AIDS, ecc., caratterizzato dal fatto che detti campi SELF non termici hanno intensità compreso tra 1 e 30 mT detti campi SELF essendo diverse sequenze di campi S/ELF, quali campi S seguiti da campi ELF, campi ELF seguiti da campi S, campi S ed ELF insieme, nonché la  
20 presenza di campi S o ELF singolarmente, detti campi ELF avendo una frequenza compresa tra 1 e 1000 Hz.

13. L'uso di campi SELF non termici per l'alterazione biotecnologica di geni, quali particolari per alterazione del gene p53 mutante, caratterizzate dal fatto che detti  
25 campi SELF non termici hanno intensità compreso tra 1 e 30 mT, detti campi SELF essendo diverse sequenze di campi S/ELF, quali campi S seguiti da campi ELF, campi ELF seguiti da campi S, campi S ed ELF insieme, nonché la presenza di campi S o ELF singolarmente, detti campi ELF  
30 avendo una frequenza compresa tra 1 e 1000 Hz.

14. Uso di campi SELF non termici secondo le rivendicazioni 12 o 13, in cui all'aggiunta di campi SELF vengono utilizzate sostanze chimiche.

- 26 -

TITOLO

APPARECCHIATURA E METODO PER INTERFERIRE CON IL  
MECCANISMO DI SOPRAVVIVENZA DI CELLULE MALATE

RIASSUNTO

5 Un metodo ed una apparecchiatura per interferire  
sulla sopravvivenza di cellule malate, in particolare  
inducendo l'apoptosi su cellule malate viventi,  
utilizzando campi magnetici senza danneggiare le cellule  
normali. Le cellule malate sono del tipo presente in  
10 malattie causate da alterazione nel meccanismo di  
sopravvivenza cellulare, quali in particolare cancro,  
infezioni virali, malattie di tipo autoimmune,  
disturbi neurodegenerativi, AIDS. Vengono utilizzati  
campi magnetici statici (S) e a frequenza estremamente  
15 bassa (ELF) aventi un intensità compresa tra 1 e 30 mT.  
In particolare, vengono utilizzati campi SELF, intesi come  
diverse sequenze di campi S/ELF, quali campi S seguiti da  
campi ELF, campi ELF seguiti da campi S, campi S ed ELF  
insieme, nonché la presenza di campi S o ELF  
20 singolarmente, con campi ELF aventi una frequenza tra 1 e  
1000 hertz. Inoltre, possono essere utilizzati campi SELF  
non termici per alterazioni biotecnologiche di geni quali  
in particolari per alterare il gene mutante p53.  
Un'apparecchiatura per realizzare il metodo comprende  
25 mezzi per generare campi magnetici statici S attraversanti  
un ambiente di lavoro e/o per generare campi  
elettromagnetici a frequenze estremamente basse ELF  
attraverso l'ambiente di lavoro. Sono previsti mezzi per  
modulare i campi S associati ai mezzi per generare i campi  
30 S e quindi variare la loro intensità da 1 a 30 mT. Possono  
essere anche previsti mezzi per modulare i campi ELF  
associati ai mezzi per generare i campi ELF ed in grado di  
imporgli una frequenza compresa tra 1 e 1000 Hz con  
intensità compresa tra 1 e 30 mT.